



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1

(21) 4651517/13

(22) 24.02.89

(46) 30.04.92. Бюл. № 16

(71) Научный центр по разработке и внедрению современных методов молекулярной диагностики, МГУ им. М.В.Ломоносова и Всесоюзный научно-исследовательский институт гриппа

(72) А.В.Овчаренко, А.В.Кабанов, Н.С.Мелик-Нубаров, В.Ю.Алахов, А.И.Банников, Т.П.Лисок, В.И.Киселев, А.В.Левашов, Н.Г.Черненко, Е.Н.Клюшненко, П.Г.Свешников, О.И.Киселев, Е.С.Северин, Р.В.Петров, В.А.Кабанов, С.А.Аржаков и Е.В.Батракова

(53) 576.8.094.29(088.8)

(56) Magee N.E., Miller O.V. Nature, 1972, v.235, p.339-341.

2

(54) СПОСОБ ПОДАВЛЕНИЯ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСОВ

(57) Использование: медицинская биохимия. Сущность изобретения: в способе подавления репродукции вирусов в качестве противовирусных агентов используют антитела с ковалентно присоединенными к ним остатками жирных кислот. При этом эффективность подавления репродукции вирусов составляет 1,5-2 порядка. Выход противовирусных агентов составляет 90-100% от исходных антител, препараты стабильны в течение года. 3 табл.

Изобретение относится к медицинской биохимии и касается способа подавления репродукции вируса антителами, специфическими к антигенным детерминантам этого вируса. Способ открывает новые перспективы в медицине, в частности в области создания противовирусной терапии, а также в фундаментальных исследованиях: изучения механизмов вирусной репликации, действия компонентов иммунной системы и т.д.

Известен способ для подавления вирусной активности с помощью антител, специфических к антигенным детерминантам вируса.

Однако вследствие непроницаемости клеточных мембран для антител последние не могут взаимодействовать с внутриклеточными вирусными частицами и, следовательно, не способны оказывать влияние на репродукцию вируса, генактивируя только внеклеточные вирусные частицы.

Наиболее близким к предлагаемому по сущности и достигаемому эффекту является способ подавления репродукции вируса с помощью антител путем воздействия на зараженные вирусом клетки антителами, специфическими к антигенным детерминантам этого вируса, включенными в липосомы, поскольку липосомы могут обеспечивать доставку антител внутрь клетки. Культуры клеток ML инкубируют с липосомами из сфингомиелина, холестерина и стеариламина, содержащими иммуноглобулины G(IgG) с высоким титром к вирусу Коксаки А-21, и заражают этим вирусом. Через двое суток определяют инфекционную активность образовавшегося вируса. Для клеток, инкубированных с липосомами, наблюдают 23-74%-ное снижение инфекционной активности по сравнению с клетками, зараженными вирусом, но не инкубированными с липосомами.

Недостатками известного способа являются низкая эффективность противовирусного действия, а также сложность процедуры получения липосом, содержащих антитела, и низкая эффективность включения антител в липосомы, что приводит к значительным потерям антител при приготовлении противовирусного препарата. Кроме того способ характеризуется низкой стабильностью липосом, затрудняющей длительное хранение противовирусного препарата.

Цель изобретения – повышение противовирусного действия и упрощение способа.

Поставленная цель достигается тем, что согласно способу в качестве противовирусных агентов используют специфические к антигенным детерминантам вируса антитела с ковалентно присоединенными к ним остатками жирных кислот.

Эффективность способа доказана на примерах подавления репродукции модельных вирусов, а именно вирусов гриппа различных серотипов и респираторно-синтициального вируса. При действии на зараженные вирусом клетки антитела, специфичные к антигенным детерминантам этого вируса, с ковалентно присоединенными к ним остатками жирных кислот обеспечивают значительное подавление (на 1.5–2 порядка, см. табл.1–3) репродукции вируса.

В качестве антител можно использовать иммуноглобулины различных классов и их суммарные фракции. В качестве модифицирующих антител реагентов можно использовать различные липиды – производные синтетических и природных жирных кислот.

Пример 1. Получение антител, модифицированных остатками жирных кислот.

К 10 мл 0.1 М раствора натриевой соли ди-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты в октане добавляют 450 мкл 1 мМ раствора антител в 0.1 М боратном буфере, pH 9.5. Систему интенсивно перемешивают в течение 1–2 мин до появления оптической прозрачности, а затем добавляют к ней 450 мкл 5 мМ раствора хлорангидрида или N-оксисукцинимидного эфира жирной кислоты (стеариновой или пальмитиновой, или миристиновой и др.) в октане. Через 2 ч белок осаждают из реакционной системы на холоде (0°C) 30 мл ацетона. Выпавший осадок отделяют и промывают 4–5 раз 30 мл холодного (4°C) ацетона.

Остаток ацетона удаляют на ротаторном испарителе.

Модифицированные антитела фракционируют гидрофобной хроматографией на

фенил-сефарозе и определяют выход модифицированного белка. Степень модификации иммуноглобулинов определяют, используя для модификации радиоактивно меченные жирные кислоты.

Аффинность антител определяют методом твердофазного иммуноферментного анализа и методом радиоиммуноанализа.

Модифицированные антитела хранят в сухом состоянии при пониженной температуре (-10–(-15)°C).

Выход модифицированных антител по белку составляет 95–100%. Модифицированные антитела содержат 1 остаток жирной кислоты на молекулу белка. Они сохраняют 80–100% специфической активности (аффинности) по сравнению с исходными (немодифицированными) антителами. При хранении в сухом состоянии в течение длительного времени (более года) активность модифицированных антител снижается не более чем на 20%.

Пример 2. Репродукция вируса гриппа (штам А/Чили, серотип H1N1) в пермиссивных клетках МДСК.

Монослой пермиссивных клеток МДСК заражают вирусом гриппа (штамм А/чили, серотип H1N1) со множественностью 1–10 бляшкообразующих единиц на 1 клетку. Через 3.5 ч после заражения к клеткам добавляют антитела (нормальные кроличьи IgG; нормальные кроличьи IgG, модифицированные остатками жирной кислоты; специфические кроличьи IgG против вируса гриппа серотипа H1N1; специфические кроличьи IgG против вируса гриппа серотипа H1N1, модифицированные остатками жирной кислоты) в концентрации, равной их титру в реакции торможения гемагглютинации. Через 8.5 ч после заражения клетки промывают 2 раза 2-кратным объемом среды, в течение 1 ч выдерживают с 2-кратным объемом среды, промывают 5-кратным объемом среды и добавляют к ним свежую среду, не содержащую антител.

Через 24 ч после заражения отбирают культуральную среду, осаждают клетки и клеточный дебрис 2-кратным центрифугированием при 8000 об/мин в течение 20 мин. В супернатанте определяют инфекционную активность в эмбриональных инфекционных дозах (ЗИД₅₀/мл) и гемагглютинирующую активность в реакции гемагглютинации с 0.7% куриными эритроцитами (ГАЕ/мл).

Результаты приведены в табл.1.

Пример 3. Репродукция вируса гриппа (штамм А/Техас, серотип H3N2) в пермиссивных клетках МДСК.

То же, что в примере 2, но используют вирусы гриппа (штамм А/Техас, серотип

Н3N2) и антитела, специфические к вирусу гриппа серотипа Н3N2.

Результаты приведены в табл.2.

П р и м е р 4. Репродукция РС-вируса (штамма Long) в перmissive клетках Hela.

Монослой перmissive клеток Hela заражают респираторно-синтициальным вирусом (РС-вирусом) (штамм Long) со множественностью 1–10 цитопатических единиц (ЦПД₅₀) на 1 клетку. Через 6 ч после заражения к клеткам добавляют антитела (нормальные кроличьи IgG; нормальные кроличьи IgG, модифицированные остатками жирной кислоты; специфические кроличьи IgG против РС-вируса; специфические кроличьи IgG против РС-вируса, модифицированные остатками жирной кислоты) в концентрации, равной их титру в реакции связывания комплемента с очищенным вирусом. Через 13 ч после заражения клетки промывают (как описано в примере 2) и добавляют к ним свежую среду, не содержащую антител.

Через 28 ч после заражения отбирают культуральную среду, осаждают клетки и клеточный дербис 2-кратным центрифугированием при 2000 об/мин в течение 25 мин. В супернатанте определяют инфекционную активность по цитопатическому действию на культуре клеток Hela (ЦПД₅₀/мл).

Результаты приведены в табл.3.

Как показано в примерах (табл.1–3), подавление репродукции вируса путем воздействия на зараженные вирусом клетки антителами, специфическими к антигенным

детерминантам этого вируса, составляет 1.5–2 порядка, в то время, как в известном способе подавление не превышает 1 порядка. Сопоставление данных, приведенных в примерах и известном способе, свидетельствует о том, что подавление репродукции вируса требует по данному способу по крайней мере на 2 порядка меньших концентраций антител.

При получении противовирусных агентов путем модификации специфических к антигенным детерминантам вируса антител остатками жирных кислот выход модифицированных антител составляет 95–100% в то время как в известном способе не более 10% взятых антител удается включить в липосомы. Кроме того, антитела с ковалентно присоединенными к ним остатками жирных кислот можно хранить в сухом состоянии в течение длительного времени (более 1 года) без значительной потери специфической активности, в то время как противовирусные агенты, используемые в известном способе (антитела, включенные в липосомы) нельзя хранить более нескольких дней.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ подавления репродукции вирусов путем воздействия на зараженные вирусом клетки иммобилизованными антителами, специфическими к антигенным детерминантам этого вируса, отличающийся тем, что, с целью повышения противовирусного действия и упрощения способа, используют антитела с ковалентно присоединенными к ним 1–2 остатками жирных кислот.

Т а б л и ц а 1

Репродукция вируса гриппа (штамм А/Чили. серотип Н1N1) в перmissive клетках МДСК (пример 2)

Условия эксперимента	Инфекционная активность через 24 ч. Ig (ЭИД ₅₀ /мл)	Гемагглютинирующая активность через 24 ч (ГАЕ/мл)
1	2	3
Зараженные клетки не инкубируют с антителами	5.3	8
Зараженные клетки инкубируют с:		
нормальными IgG кролика	5.3	8
нормальными IgG кролика, модифицированными остатками стеариновой кислоты	5.3	8
нормальными IgG кролика, модифицированными остатками пальмитиновой кислоты	5.3	8
специфическими IgG кролика против вируса гриппа серотипа Н1N1	5.0	8

1	2	3
специфическими IgG кролика против вируса гриппа серотина H1N1, модифицированными остатками стеариновой кислоты	3.5	2
специфическими IgG кролика против вируса гриппа серотина H1N1, модифицированными остатками пальмитиновой кислоты	3.5	2

Таблица 2

Репродукция вируса гриппа (штамм А/Техас, серотип H3N2) в пермиссивных клетках МДСК (пример 3).

Условия эксперимента	Инфекционная активность через 24 ч. Ig (ЭИД ₅₀ /мл)	Гемагглютинирующая активность через 24 ч (ГАЕ/мл)
Зараженные клетки не инкубируют с антителами	6.5	512
Зараженные клетки инкубируют с: нормальными IgG кролика	6.3	512
нормальными IgG кролика, модифицированными остатками стеариновой кислоты	6.5	512
нормальными IgG кролика, модифицированными остатками миристиновой кислоты	6.5	512
специфическими IgG кролика против вируса гриппа серотина H3N2	6.5	512
специфическими IgG кролика против вируса гриппа серотина H3N2, модифицированными остатками стеариновой кислоты	5.0	128
специфическими IgG кролика против вируса гриппа серотина H3N2, модифицированными остатками миристиновой кислоты	5.0	128

Таблица 3

Репродукция РС-вируса (штамм Long) в пермиссивных клетках Hela (пример 4)

Условия эксперимента	Инфекционная активность через 28 ч. Ig (ЦПД ₅₀ /мл)
1	2
Зараженные клетки не инкубируют с антителами	5.4
Зараженные клетки инкубируют с: нормальными IgG кролика	5.5
нормальными IgG кролика, модифицированными остатками стеариновой кислоты	5.5
специфическими IgG кролика против РС-вируса	5.3

Продолжение табл. 3

1	2
специфическими IgG кролика против РС-вируса, модифицированными остатками стеариновой кислоты	3,5

5

10

15

20

25

30

Редактор М.Петрова

Составитель С.Пылова
Техред М.Моргентал

Корректор Н.Ревская

Заказ 1488

Тираж

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул.Гагарина, 101